



**KONGERIKET NORGE**  
The Kingdom of Norway

REC'D 27 AUG 2003

WIPO

PCT

Bekreftelse på patentsøknad  
nr

*Certification of patent application no*

2002 3601

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

► Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 2002.07.29

► *It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 2002.07.29*

2003.08.01

*Freddy Strømmen*

Freddy Strømmen  
Seksjonsleder

*Line Reum*  
Line Reum



PATENTSTYRET

02-07-29\*20023601

AJJ/DLA

25.07.2002

E26152

AMI GO AS  
Lysaker Torg 25  
1366 Lysaker

Oppfinner(e):

Tomas Carlsson  
Lesja Gjestgiveri  
2665 Lesja  
Norge

Fremgangsmåte for hydrolysing av proteiner

Foreliggende oppfinnelse angir en fremgangsmåte for utvinning av peptider, frie aminosyrer og mineraler fra animalske/akvatiske råvarer.

5 Det er kjent i industrien å produsere peptider og aminosyrer gjennom syrehydrolyse, samt med bioteknologisk og eller kjemisk/teknisk, både naturlig og kunstig produserte, koncentrerte enzymer. Foreliggende oppfinnelse er en måte å bruke de naturlig forekommende nedbrytningsenzymene fra animalske/akvatiske råvarer i en industriell prosess som gir et produkt med farmasøytisk, bioteknologisk eller  
10 næringsmiddelskvalitet.

Med farmasøytisk kvalitet menes produkter for intravenøs bruk og produkter som er klassifisert som medisin for mennesker og dyr eller naturmedisin.

15 Med bioteknologisk kvalitet menes produkter som kan benyttes som for eksempel dyrkingsmedia eller katalysator i dyrking av celler, bakterier, fungi og alger.

Med næringsmiddelskvalitet menes produkter som brukes for humankonsumering enten som additiv eller som selvstendig produkt.

20 Oppfinnelsen kan naturligvis også brukes til å produsere førprodukter, i form av et additiv eller som selvstendige produkter.

25 Aminosyrer og peptider er velkjente innen farmasøytisk, naturmedisinsk og veterinarmedisinsk industri som bestanddeler i produkter som for eksempel intravenøs ernæring samt som spesialernæring for å lindre visse trauma. Her har det frem til nå hovedsaklig vært benyttet ekstrakter fra blodplasma og proteinhydrolysat produsert med pankreas enzymer fra svin og kalv. Oppfinnelsen gir farmasøytisk industri en mulighet til å få tilgang til aminosyrer og peptider av en hittil ukjent kvalitet.

30 Aminosyrer og ultrakorte peptider anvendes også for bioteknologiske prosesser, for eksempel når et høypotent dyrkingsmedium skal produseres. Begrensende for all industri som dyrker encellede organismer eller cellesubstrat fra høyere organismer er tilgangen på dyrkingsmedia med tilstrekkelig kvalitet. Brist eller høy pris er  
35 begrensende. Dessuten inneholder aminosyrer eller peptider fremstilt ved hjelp av bioteknologiske metoder som regel veksthemmende stoffer som kan unngås ved hjelp av produktene fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Kombinasjonen av

naturlige aminosyrespektra og biologiske sporemner/mineraler som den beskrevne prosessen produserer gir et unikt produkt for produksjon av dyrkingsmedia for bioteknologiindustrien. Dessuten kan teknikken resirkulere proteiner fra mange typer kulturer tilbake til aminosyrer og peptider som deretter kan brukes på nytt.

5 Peptider/aminosyrer brukes i næringsmiddelindustrien, som bindemidler, emulgatorer, smakstilsetning, og liknende. Anvendelsene er betydelige og stigende. De mest  
10 anvendte peptider og aminosyrer i næringsmiddelindustrien stammer fra soyabønner og melk. Spesielt aminosyrer og peptider fra soya og melk er kjent for å forårsake allergene reaksjoner som kun kan unngås hvis man anvender en annen  
15 peptid/aminosyresammensetning som ikke stammer fra disse kilder eller en peptid/aminosyresammensetning fra soya og melk som er tilstrekkelig modifisert for å ikke forårsake disse reaksjoner. Således er det et stort behov for en fremgangsmåte som tilveiebringer en sammensetning av aminosyrer og peptider som også kan stamme fra  
20 soya og/eller melk, men som ikke forårsaker allergene reaksjoner. Produkter fra de fleste animalske kilder har ikke oppnådd samme grad av anvendelse, da det ikke finnes  
25 ekstraksjonsteknikker som kan bevare produktets funksjonalitet og samtidig fjerne uønskede kvalitetsforringende komponenter som for eksempel salt og fett.

20 Innen førproduksjonen anvendes mange forskjellige sammensetninger av proteiner, peptider og aminosyrer som stammer fra ulike kilder. I førproduksjonen er  
25 sammensetning av peptidene, aminosyrene og proteinene også meget viktig ettersom dyrenes vekstevne er avhengig av et balansert forinntak. Således er det også her et stort behov for en fremgangsmåte som tilveiebringer en hvilken som helst ønsket  
30 sammensetning som gir optimale vekstbetingelser for dyrene.

I det følgende brukes uttrykket "endogene" enzymer som et uttrykk for proteinproduktets egne enzymer i motsetning til de "eksogene" enzymer som er fremmedenzymer som tilsettes råvaren av proteiner i forbindelse med en tradisjonell  
35 hydrolyse. Et eksempel på et "eksogent" enzym er "Deterzyme APY", som er en bakteriell protease (E.C.3.4.21) fremstilt ved kontrollert fermentering av *Bacillus alcalophilus* og som kan kjøpes fra flere leverandører.

Med endogen enzymer menes også enzymer ekstrahert fra andre lignende naturlige  
35 enzymvarer/råvarer, fortrinnsvis fra kaldblodige dyr.

Benevningen hydrolysat er i den nedenstående teksten brukes som en betegnelse på de råvarer som befinner seg under prosessering.

Det foreligger flere patenter innenfor oppfinnelsens område som for eksempel RU 5 2103360 som beskriver et næringsmedium for kultivering av eukaryotceller og en fremgangsmåte for fremstilling av et hydrolysat fra fiskeslo som fremstilles ved proteolytisk hydrolyse. Denne hydrolyseprosessen gjennomføres med en høy pH justert med natriumhydroksid, ved hjelp av temperaturinaktivering, filtrering og tørring hvor fiskeavfallet blandes med destillert vann i forhold 1:1, og ved at hydrolysen skjer ved en 10 temperatur på +40° - +42°C inntil man oppnår en vektandel på aminonitrogen på 5,5- 6,5% og en vektandel på frie aminosyrer på 50-60%.

Dessuten er det i SU 1755417 kjent en fremgangsmåte for produksjon av hydrolysater av fiskeråvaren i en fermentor hvor det tilsettes et fermenteringspreparat fulgt av 15 filtrering og tørring av produsert hydrolysat, hvor man anvender ikke-knust råvare som mater periodisk inn i fermentoren.

RU 1559466 beskriver en fremgangsmåte for produksjon av hydrolysater, som forutsetter knusing av fiskeprodukter eller avfall fra foredling av disse, blanding med 20 vann, oppvarming av blandingen, tilsetning av et proteolytisk fermenteringspreparat, fermentering, filtrering og tørring, hvor blandingen av råstoff og vann skjer i forhold 2:1 - 1:1, oppvarmingen skjer opptil +40° - +45°C, mens fermentasjon foretas over 0,5 - 2,5 timer ved bruk av det eksogene enzymet protosubtilin G3x.

25 Ytterligere nevnes FR 2168259 som beskriver en enzymatisk hydrolyse av fiskeproteiner som utføres ved å knuse fersk fisk til en fin masse uten å tilsette vann. Det tilsettes eksogene enzymer og massen hydrolyses i ca 15 timer avhengig av ønsket løselighet. Produktet stabiliseres i 5-20 minutter ved +90° - +100°C, filtreres, pasteuriseres og centrifugeres. Prosessen gir produkter med høy næringsverdi.

30 Som vist over er det kjent forskjellig teknikk for frigjøring av proteiner, peptider og aminosyrer fra fisk som er egnet for næringsmiddelproduksjon. Dessuten er det kjent å fremstille også olje/fett fra råmaterialet fra plante- så vel som animalske råvarer.

35 Formålet med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en fremgangsmåte for fremstilling av et proteinhydrolysat basert på bruk av naturlige enzymer uten tilsetning

av noen ikke naturlige stoffer. Dette i motsetning til andre metoder som bruker enzymer fra mange forskjellige kilder slik som fra bakteriekulturer o. lign.

5 Videre er det et formål at prosessen skal tilveiebringe et produkt som er helt fritt for protein og DNA samt andre allergene stoffer og at dette skjer uten at det går ut over utnyttelsen av råvarene. Metoden skal også redusere fettet i sluttproduktet til et så lavt nivå at ulempene med bruk av fiskeråvarer elimineres. Det skal tilveiebringes et produkt som skal kunne brukes innenfor mange forskjellige områder hvor fettinnholdet i produkter produsert med kjente metoder har begrenset eller umuliggjort dette.

10

Videre er det et formål å utnytte råvarene mest mulig fullstendig og at belastningen av miljøet i forbindelse med produksjonen blir lavest mulig.

15 Således er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for utvinning av peptider/aminosyrer og olje/fett fra en proteinholdig råvarer, kjennetegnet ved at den innbefatter følgende trinn:

20

25

30

35

- a. å kverne råvarene;
- b. å oppvarme den kvernede råvarene til temperaturer i området fra 40 - 62°C, fortrinnsvis 45 - 58°C;
- c. å eventuelt før og/eller etter separere olje/fett fra råvaren for å oppnå et første oljeprodukt;
- d. å tilsette vann som holder tilnærmet eller samme temperatur som råvaren, hvor pH-verdien av vannet er justert ved tilførsel av kalsium;
- e. å hydrolyser råvarene med endogene enzymer eller enzymer fra lignende råvarer fortrinnsvis fra kaldblodige arter, for å fremstille et hydrolysat;
- f. å eventuelt under hydrolyseringen tilsette en pH-regulator for å opprettholde den ønskede pH-verdi i hydrolysatet;
- g. å fjerne faste partikler og ikke hydrolyserte proteiner som kan returneres til hydrolysen fra hydrolysatet;
- h. å periodisk eller kontinuerlig skille ut fett/olje, for å oppnå et andre oljeprodukt;
- i. å eventuelt behandle hydrolysatet mot mikroorganismevekst, fortrinnsvis ved UV-behandling;
- j. å utskille den molekylvektfraksjon av peptider/aminosyrer som ønskes ved membranfiltrering, fortrinnsvis av crossflow type;

- k. å tilbakeføre de deler av hydrolysatet som ikke penetrerer membranfiltret i punkt j tilbake til hydrolysen i trinn e;
- l. å konsentrere og eventuelt tørke permeaten, for å oppnå peptider/aminoesyror;
- 5 m. å helt eller delvis tilbakeføre destillatet fra konsentrasjonen til membranfilterets permeatside.

Foretrukne trekk ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen fremgår fra medfølgende krav 2-5.

10

Med membranfilter menes i denne sammenheng membranlignende filterer slik som membranfiltrer, osmotiske filter, ultrafiltre, elektrostatiske filter, crossflow filter og lignende. Disse bør fortrinnsvis være kjennetegnet ved en "cut-off"-verdi på mindre enn eller lik 10.000 Dalton.

15

Dessuten er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for hydrolysing av en eller flere proteinholdige råvarer og utskillelse av aminosyrer/peptider kjennetegnet ved at hydrolyseringen foregår ved hjelp av den eller de proteinholdige råvarenes egne endogene enzymer og at hydrolysatet føres gjennom et membranfilter, hvor peptider/aminoesyror følger en permeat strøm, mens de aktive enzymene kontinuerlig nedbryter eventuelle proteinrester som avleires på membranoverflaten og at enzymene føres sammen med retenat tilbake til hydrolysen.

25

Et ytterligere trekk ved oppfinnelsen er en fremgangsmåte for utskillelse av peptider og aminosyrer fra en hydrolyseblanding kjennetegnet ved at hydrolyseblandingen omfattende aktive enzymer, aminosyrer, peptider og ikke omdannede proteiner føres henover et membranfilter, hvor aminosyrer og eventuelt peptider filtreres fra og de tilstedeværende aktive enzymene sørger for å nedbryte proteiner som avleires på membranfiltret.

30

Oppfinnelsen innbefatter også en anvendelse av en av fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et farmasøytsk produkt, et bioteknologisk produkt, et næringsmiddelprodukt, samt et førprodukt.

35

Oppfinnelsen omfatter også anvendelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for fremstilling av hydroksyapatitt.

Ytterligere er det tilveiebrakt aminosyrer/peptider fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at de ikke inneholder allergener og DNA-spor.

Der er også tilveiebrakt en olje fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at den ikke inneholder allergener og DNA-spor.

Endelig er det tilveiebrakt hydroksyapatitt fremstilt ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kjennetegnet ved at det ikke inneholder allergener og DNA-spor.

10 Foreliggende oppfinnelse løser på den ene siden problemet med å tilveiebringe produkter med et bredt kvalitetsspekter som varierer fra anvendelse for næringsmiddelproduksjon til anvendelse i produkter som skal tilfredsstille kravene til for eksempel legemidler og lignende.

15 Foreliggende oppfinnelse løser dette problemet ved å anvende råvarenes egne endogene enzymer og tilpasse produksjonsbetingelsene til disse enzymer.

Denne oppfinnelsen kombinerer anvendelsen av endogene enzymer med en teknikk for å utvinne spesifikke størrelsesbestemte molekyler, fra enkelt aminosyrer opp til store peptider like under 10.000 dalton.

Oppfinnelsen innebærer at enzymene bibeholdes i fermenteringsprosessen mens de frigjorte aminosyrer og peptider utskilles.

25 Oppfinnelsen innebærer videre at hydrolyseringsprosessen kan kjøres kontinuerlig med tilsetning av ytterligere råvarer underveis.

Prosessen skiller seg vesentlig fra tidligere kjente enzymeringsprosesser ved at denne ((kan) foregå(r)):

30

- uten tilsetninger, som for eksempel kloroform, for å unngå uønsket bakterievekst;
- uten tilsetning av natriumhydroksid
- med mulighet for varm- og kaldutvinning av proteinfri(tt) og steril(t) marin(t) olje/fett;
- med mulighet til å styre spektret av frie aminosyrer og peptider i sluttproduktet ved valg av råvarer for prosessen gjennom valg av spesifikke råvarer;

35

- med mulighet at styre resultatet av prosessen, med hensyn til aminosyre- og peptidsammensetning ved hjelp av de anvendte prosessparametrene så som temperatur og pH
- uten tilsetning av syre;
- 5 - med fleksible kombinasjon av ulike råvarer;
- ved hjelp av tilpasset konsentrering for utskilling av produktfraksjoner; og ved at den
- ved bruk av en kontinuerlig enzymnedbrytningsprosess;
- uten koagulering av proteiner og/eller peptider ved bruk av syre eller base;
- 10 - ved størrelsesgradering av de peptider man produserer
- gir et produkt som inneholder mineraler og sporemner med biologisk opphav.

Således er det tilveiebrakt en fremgangsmåte for utvinning av peptider/aminoesyre, mineraler og olje/fett fra proteinvare fortrinnsvis med akvatisk opphav.

15 Kjent teknikk skiller seg fra foreliggende oppfinnelse ved en grunnleggende forskjellig fremgangsmåte for fremstilling av fiskeproteiner, som dessuten foreligger i forskjellige fraksjoner med peptider og aminoesyre. Produksjonsbetingelsene skiller seg dessuten vesentlig fra denne teknikken og igjen unngår man ved den foreliggende oppfinnelsen  
 20 bruk av eksogene enzymer. I tillegg som også vist ved de tidligere nevnte mothold tilveiebringer man med foreliggende oppfinnelse marine oljer/fett av høy kvalitet ved fremstilling av en annen spesifikk fremgangsmåte som ikke er beskrevet i kjent teknikk.

25 Fremgangsmåten som er beskrevet er en naturlig enzymering av proteiner med det formål å oppnå tørkete sluttprodukter eller flytende produkter med ulike sammensetninger av peptider og frie aminoesyre. Prosessen gir ferdige produkter som valgfritt inneholder fra 5% til 100% frie aminoesyre. Produktet inneholder ikke allergener og DNA spor. Det finnes kun meget små mengder med fett, typisk mindre enn 0,1%, samt biologiske sporemner. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen gir et  
 30 produkt som er fullt brukbart som dyrkningsmedia for alle typer av kulturer, inkludert celler fra høyere organismer.

Foreliggende oppfinnelse muliggjør en fremgangsmåte uten bruk av natriumhydroksid som kan føre til problemer ved produksjon av aminoesyre og peptider i industriell  
 35 målestokk. Dessuten kan vannforholdet varieres i et betydelig større omfang sammenliknet med kjent teknikk og vektandelen på frie aminoesyre befinner seg også i et større område.

I forhold til denne teknikken bruker man i foreliggende oppfinnelse både knust og ikke-knust utgangsmateriale og det tilsettes ikke et fermenteringspreparat, men det anvendes de naturlige enzymer som allerede foreligger i råstoffet. Således utnyttes

5 proteinråvarens endogene enzymer som fører til en enklere, mer stabil og billigere måte å gjennomføre hydrolysen på. I tillegg må betingelsene direkte tilpasses de endogene enzymenes aktivitetsbetingelser som også er forskjellige sammenliknet med kjent teknikk.

10 Et ytterligere problem som finnes i denne bransjen er at eksogene enzymer er dyre og kan ha varierende kvalitet. Den foreliggende oppfinnelsen unngår dette problemet ved en resirkulering av de endogene enzymer.

15 Ytterligere har de aktive enzymer en spesifikk rengjøringsfunksjon. Ettersom de holdes tilbake i filteret virker disse enzymer på ikke-filtrerte proteiner og peptider. Enzymene bevirker nedbrytning av disse materialer og således har filteret en lengre oppretthold yteevne sammenliknet med tradisjonelle filtreringsprosesser som anvendes ved hittil kjente hydrolyseprosesser. Det er en stor fordel med hensyn til kostnader, levetid og effektivitet av filtrene, kvalitet av produktene og utnyttelsesgrad av systemet/prosessen.

20 I tillegg beskriver metoden utvinning av oljer/fett og faste stoffer. Et av de faste stoffer som kan oppnås ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er hydroksyapatitt. Hydroksyapatitt anvendes for eksempel i biokromatografi og andre bioteknologiske separeringsprosesser, ved NMR og andre deteksjonsprosesser, og er således et 25 kommersielt interessant biprodukt fra prosessen.

Valg av teknikk og prosessparametere vil avgjøre hvilket sluttprodukt man får. På denne måten kan man tilpasse produkter til kundens ønsker.

30 Figur 1 viser en utførelsesform av et anlegg i hvilket man anvender hydrolyseringsprosessen ifølge oppfinnelsen. Henvisningstallene til figuren står for følgende deler av anlegget:

35

1. Fermentor
2. Separeringsenhet for utskilling faste partikler, fortrinnsvis en sikt
3. Separeringsenhet, fortrinnsvis en centrifuge av dekantertypen
4. Flotteringstank for separering proteiner og hydroksyapatitt

- 5. Separeringsenhet for utskilling av olje, fortrinnsvis en centrifuge
- 6. Filterenhet for sterilfiltrering
- 7. Tank for olje/fett
- 8. Mikroorganisme-reduksjonsenhet
- 5 9. Membranfilterenhet
- 10. Konsentreringsenhet
- 11. Tørkeenhet
- 12. Kverneutstyr
- 13. Sentrifuge fortrinnsvis av trekantertypen
- 10 14. Filter for olje
- 15. Tank for olje utvunnet før hydrolyseringen
- 16. Varmeveksler for oppvarming av råvarer
- 17. Kalsiumdoseringsanordning
- 18. Varmeveksler for oppvarmning av vannet
- 15 19. Anordning for tilførsel av benmel
- 20. Anordning for tilsetning av nitrogen
- 21. Beholder for utvunnet benfraksjon

I tillegg viser figur 1 sammen med beskrivelsen av anlegget en utførelsesform av prosessen ifølge oppfinnelsen, hvor bokstavene står for følgende strømmer:

- A. Strøm innbefattende proteiner, enzymer, olje/fett, peptider og frie aminosyrer, etter mikroorganisme reduksjonsenheten 8 inneholder strømmen ingen faste partikler, og en betydelig redusert andel ikke hydrolyserte proteiner og fett hvis separeringsenhetene 2 og 3 har vært brukt;
- 25 A1 Strøm hvis separeringsenhet 2 brukes, etter enheten 2 innholder strømmen ikke lengre faste partikler;
- A2 Strøm hvis separeringsenhet 3 ikke benyttes;
- B1 strøm innbefattende faststoffer utskilt med sikt.
- 30 B2 strøm innbefattende faststoffer utskilt med centrifuge
- C. Strøm innbefattende olje/fett
- D. Strøm av destillat eller lignende for utløsning av permeat fra membranfilteret 9
- E. Strøm av konsentrert peptid-aminosyre-løsning til tørkeenheten.
- 35 E1 strøm av konsentrert peptid-aminosyre-løsning til pakking som flytende vare;
- F. Strøm av råvarer til fermentor 1;
- F1 strøm av råvarer når olje utskillelse ikke skjer før hydrolysen;

- G. Strøm av ikke hydrolyserte proteiner tilbake til strøm A;
- H. Strøm av tilsetningsvann.

Med mindre annet er anført er alle prosent angivelser her i vektprosent.

5

I det følgende beskrives prosessen nærmere:

**1) Råvarer:**

10 Råvarene til prosessen kan bestå av proteinvare fortrinnsvis fisk, fiskeprodukter, skalldyr, krepsdyr, bløtdyr og biprodukter fra fisk /fiskeindustri for eksempel fiskeslo og andre marine organismer fra ferskvann og saltvann. De ulike råvarene kan anvendes enkeltvis eller i kombinasjon av produkter som inneholder "enzymvare" og "proteinvare". "Enzymvaren" er råmaterialet som inneholder de endogene enzymer i tilfredsstillende mengde og kvalitet. "Proteinvaren" beskriver råmaterialer som ikke innbefatter de endogene enzymene i tilfredsstillende mengde og kvalitet og som således må suppleres med enzymvaren for å kunne gjennomføre enzymbehandling. I noen tilfeller kan enzymvaren være identisk med proteinvaren. Tidligere kjente prosesser beskriver en sammensetning mellom slo og proteinvare som forholdet 1:1. Metoden beskrevet her gjør det mulig å variere dette forholdet for å oppnå det ønskete resultat i sluttproduktet.

25 Råvarene fyller de lovbestemte kravene for utgangsprodukter for fremstilling av næringsmidler. Råvarene har tidligere gjennom lovverket og definisjoner blitt klassifisert som avfall. Gjennom gode logistikk- og prosessrutiner vil man her være i stand til å få råstoffet godkjent som næringsmiddel. Det muliggjør produksjon i industriell målestokk og anvendelse av produktet i næringsmiddel- og/eller farmasøytisk industri.

30 **2) Forbehandling av råvarene:**

Råvarene pumpes inn fra tank, igjennom et kvernesystem som gir ønsket finfordeling av varene. Kverningen gir større arbeidsoverflate for enzymene samt frigjør råvarenes enzymer.

35

En første olje/fett fra råvarene kan utvinnes før enzym-prosessen settes i gang. Her kan for eksempel anvendes en kaldutvinning av oljen.

Kaldutvinning av olje kan skje ved at man:

1. Sentrifugerer råvarene og skiller ut flytende og faste partiklar i to ulike fraksjoner.
- 5 2. Separere ut oljen fra den flytende fasen.
3. Den faste fasen og den tunge fasen fra separeringen blandes og pumpes til fermentoren
4. Oljefasen fra separeringen viderebehandles til ferdig kundespesifikt produkt som ikke behøver videreraffinering for å oppnå næringsmiddelkvalitet.

10

Råvarene som skal tilsettes fermentor kan oppbevares i en eller flere buffertanker etter kverning, ulike tanker kan brukes for proteinvare og enzymvare.

15 Varene kan pumpes via en varmeveksler, til fermenteringstanken. Fermenteringstanken kan også brukes for oppvarming hvis det ikke gjøres i varmeveksler før det pumpes inn. Overvåkning av betingelsene i fermentoren gjøres kontinuerlig, enten automatisk eller ved manuell prøvetaking. Tilsetning av ulike tilsatsvarer gjøres slik at vilkårene for enzymeringen holdes så konstante som mulig innen det området som er optimalt for den varen som ønskes fremstilt.

20

### 3) Enzymeringsprosess:

Oppvarmede råvarer eller ikke oppvarmede råvarer i form av proteinvarer og enzymvarer pumpes over i en eller flere enzymeringstank/tanker. Til denne blandingen tilsettes temperert og pH justert vann som holder tilnærmet den temperatur som fermenteringen vil foregå i. Mengden vann vil kunne varieres i forhold til råstoff og ønsket resultat, beroende på en optimering av tilgjengelig enzym og proteinvare. pH justeres med tilsetning av for eksempel nitrogengass eller benmel.

25 Den tempererte og pH-justerte blandingen av råstoff og vann blir heretter kalt "hydrolysat". Hydrolysatet holdes i fermentortanken/er under konstant kraftig omrøring. Hensikten med dette er å bedre enzymeringsprosessen. Hydrolysatet pumpes kontinuerlig gjennom systemet for utskilling av de ønskede aminosyrer og peptider.

30 35 For å holde betingelsene for enzymeringen konstante i fermenteringstanken kontrolleres aminobundet nitrogen, totalt proteininnhold, temperatur og pH jevnlig.

Proteinvare og enzymvare tilsettes etter behov så lenge man ønsker at prosessen skal foregå.

Det er en forutsetning for prosessen at det er alkaliske enzymer som virker. Det er

5 derfor viktig å holde  $\text{pH} > 7,00$  ved enzymeringen.  $\text{pH}$  intervallet vil ligge mellom 7,00 og 8,50. Optimal enzymatingsprosess nås ved  $\text{pH} 7,60$  til 8,20. Hvis  $\text{pH}$  er  $> 8,1$  men  $< 8,4$  under hele prosessen ekskluderes fritt tryptofan fra aminosyrespektret omvent hvis  $\text{pH}$  er  $< 7,6$  men  $> 7,4$  under hele prosessen maksimeres tryptofan til alt som er mulig å utvinne, hvilket bestemmes av råvaren. Hvis temperaturen  $< 46^\circ\text{C}$  men  $> 44^\circ\text{C}$  og  $\text{pH}$  er

10  $< 7,8$  men  $> 7,7$  under hele prosessen oppløses kollagen ikke i større grad men oppnås som faste partikler.

Til  $\text{pH}$ -justering av hydrolysatet kan det benyttes forskjellige baser, som for eksempel benmel fra tidligere produksjon, kalsium og nitrogen.

15 Ved hjelp av den foreliggende oppfinnelsen kan man kontinuerlig styre enzymatingsprosessen ved hjelp av forskjellige parametere for å holde betingelsene på et optimalt nivå.

20 Ved avslutning av prosessen må man temperaturinnaktivere eller på annen måte avslutte enzymaktiviteten for å unngå ammoniakkdannelse.

#### 4) Kontroll av mikroorganismevekst

25 Kjent teknikk beskriver kloroform som en tilsetning for å hindre mikroorganismevekst men at det fortrinnsvis ikke benyttes i denne prosessen. Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen bruker man UV, eller annen egnet metode som ikke koagulerer enzymene, for å drepe bakterier og fungi. Dette gjøres for at ikke kraftig vekst av mikroorganismer skal forbruke de frigjorte korte peptidene og frie aminosyrrene i dannelsen av nye

30 proteiner. Dessuten er kloroform i industriell skala ikke foretrukket.

#### 5) Utskilling av faste partikler

Oppfinnelsen innebærer at faste partikler, over en viss størrelse kan utskilles fra

35 hydrolysatet enten kontinuerlig eller periodisk ved hjelp av et siktsystem/filter. Siktsystemet kan utgå fra eller kobles forbi i systemet hvis dekantersystemet i neste

produksjonstrinn klarer hele fastfaseutskillingen eller at det produkt som i den aktuelle situasjonen bearbeides, ikke inneholder faste partikler som egner seg for siktning.

De utskilte partiklene kan deretter deles opp etter densitet gjennom en floteringsprosess slik at proteinrester kan tilbakeføres til fermenteringstanken. Proteiner flyter opp og kan skummes ykk enten mekanisk eller manuelt. Det tyngre materialet havner i bunnen av floteringstanken.

### 6) Dekantering av hydrolysatet

En dekanter kan brukes i systemet før oljeseparatoren og membranfilteret. Dette gjøres for å forenkle separeringen av fett fra hydrolysatet på for eksempel en trefaseseparator og derved redusere belastningen på det etterfølgende membranfilteret.

En separator arbeider ikke optimalt om innholdet av faste partikler er for høyt, hvilket betyr at slamfasen blir stor. Dekanteren er en maskin som er konstruert for å skille ut faste partikler med større densitet enn den vesken de er del av. I oppfinnelsen er dette i hovedsak proteiner som utskilles, dermed er det ønskelig å tilbakeføre disse til fermenteringstanken for videre enzymering. Det utskilte faste materialet kan floteres etter samme prinsipp som benyttes ved siktningssystemet. Samme floteringsanordning kan eventuelt brukes. Dekanteren kan utgå/kobles ut av systemet hvis siktanordningen som tidligere er nevnt klarer den ønskede utskillingen eller at produkter som behandles ikke gir proteinrester som kan skilles ut med dekanter.

### 7) Separering

Hydrolysatet separeres med en trefaseseparator eller annen egnet centrifugeringsmetode som egner seg for å skille ut den lettere fettfraksjonen fra hydrolysatet. Utskillingen av fett foregår enten kontinuerlig eller periodisk avhengig av mengden fett i de råvarer som bearbeides. Spesielt viktig ved den foreliggende oppfinnelsen er at en meget ren og høykvalitativ fettfraksjon kan utvinnes i og med at separeringen kan gjøres kontinuerlig i prosessen slik at fettet som frigjøres ikke utsettes for oksidasjon lengre enn nødvendig, når lipoproteinene spaltes ved hydrolysen. At hydrolysen foregår under basiske forhold hjelper også til med å holde fettkvaliteten høy, særlig når nitrogen benyttes for pH justering.

### 8) Membranfiltrering

Oppfinnelsen innebærer at hydrolysatet pumpes gjennom en anordning med fortrinnsvis membranfilter som fungerer på en måte som gjør at molekyler av viss størrelse kan penetrere membranene, fortrinnsvis under 10.000 dalton. Filtreringen gjøres slik at hydrolysatet enten pumpes gjennom et antall rørformete membraner eller forbi et antall plane membraner.

Prinsippet for osmose brukes for transport gjennom membranene. Konsentrering av de utfiltrerte frie aminosyrene og peptidene gir destillert vann som biprodukt og en del av dette tilbakeføres til filtret med tilnærmet samme trykk som hydrolysatet har på den andre siden av membranen. Gjennom å holde konsentrasjonen av aminosyrer og peptider lavere på permeatsiden av membranene opprettholdes en osmosedrevet penetrasjon gjennom disse. Strømmen av hydrolysat langs membranene renser disse mekanisk for belegning av proteinrester og peptider som er større enn de som kan penetrere membranene.

I tillegg gjør forekomsten av enzym i hydrolysatet at et eventuell belegg på membranene, bestående av proteiner og peptider, løses opp.

20

### 9) Konsentrering:

Det ferdige hydrolysatfiltratet må deretter konsentreres. Dette gjøres for å fjerne vann før tørkeprosessen slik at kapasiteten av tørkingen blir utnyttet maksimalt, eller at man når det konsentreringsnivået på inngående aminosyrer og peptider som ønskes i et flytende produkt.

En destillasjonsprosess av typen vakuuminndamping er godt egnet til dette formålet, men hvilke som helst andre former av konsentreringsanordninger kan brukes til å skille ut de ønskede peptidene og aminosyrene fra væsken som de løses opp i under membranfiltreringen. Vakuuminndamperen konsentrerer væsken på lav temperatur, slik at man ikke ødelegger peptider/amino syrer. En forutsetning for at funksjonen ved membranfiltreringen i tidligere trinn skal bli optimal, er at konsentreringsanordningen kan returnere et destillat som er så rent som mulig. Dermed kan osmosen gjennom membranene bli optimal. Inndamping kan skje ved temperaturintervallet +50 - +85 °C. Optimalt vil det være fra +65 - +70 °C. Man kan risikere at kondensatet har for høy

temperatur for å bli tilbakeført til filteret eller fermenteringstanken. Om så er tilfelle må man bruke en varmeveksler som reduserer temperaturen til ønsket nivå.

#### 10) Tørking:

5 Etter konsentrering kan produktet eventuelt tørkes men det kan også foreligge som flytende produkt eller hvilket som helst form derimellom. Tørking gjør at produktet blir mer lagringsstabil, og det forenkler logistikk og håndtering. Måten produktet tørkes på er avgjørende for sluttresultatet. Et ferdig peptid-/aminosyreprodukt vil kunne være

10 svært hygroskopisk og er derfor en utfordring med tanke på denne prosessen. Høy temperatur i tørkeprosessen vil også medvirke til at produktet får en mer hygroskopisk karakter.

15 Tørking/granulering vil foregå i to trinn. Først tørkes til pulver i forstøvningstørker eller lignende, med kjølesteg og deretter blir produktet granulert. Granulering foregår ved at man "bygger" granulater ved at pulver/produkt holdes i kraftig bevegelse ved hjelp av mekanisk fluidisering. Deretter sprayes konsentratet/hydrolysatet inn i denne massen og man bygger gradvis opp granulater. Det hele er en kontinuerlig prosess. På slutten av granuleringsprosessen blåses tørket kald luft over/igjennom granulatet. Dette 20 fører til at det blir sprøere og lettere oppløselig. Granulatet siktes deretter og ønsket fraksjon tas ut. Partikler som er for små (finst) tilbakeføres for videre granulering, "oversize" kvernes og siktes på nytt. Eventuell nydannet finst går i retur til ny granulering.

25 Vanlig konvensjonell spraytørking vil også kunne anvendes, men dette gir et fint pulver med stor overflate. Dette fører til at produktet oppfører seg svært hygroskopisk og det blir derfor vanskelig å håndtere dette i store forpakninger, lagring m.m.

30 Ved granuleringsprosessen kan ulike additiver blandes i produktet, produkter som ikke er granulerte kan også fremstilles likeså som produkter som ikke tørkes, men bare konsentreres til ønsket nivå.

#### Fordypet beskrivelse av funksjonen av membranfiltret

Filtret kan være oppbygget av plane eller rørformede filterelementer.

35 Filtersystemet er oppbygget så at filtratet, som består av proteinhydrolysat fra fermentoren hvor faste partikler og fett er fjernet men inklusive enzymkompleks, kan fritt sirkuler forbi membranenes retenatside (crossflow filtrering).

Dermed skapas en strømning lengst membranenes overflate som mekanisk minimerer risikoen for dannelsen av blokkerende filterkake av retenat avsatt på membranene.

Filtratet som sirkulere på filtermembranenes retenatside inneholder enzymer som bryter ned de proteiner og store peptider som fester seg på og i membranene men er for store

5 for at passere gjennom membranene til permeatsiden. Enzymene blokkeres mot at penetrere membranene om valget av membran gjøres slik at maks molekylstørrelse på permeatet er 9800 Dalton. Hermed blokkeres ikke nedbrutte proteiner og det oppnås et proteinfritt sterilt produkt.

10 Valg av membran med blokkering av mindre molekyler vil resultere i et produkt med mindre peptider og høyre andel frie aminosyrer.

På permeatsiden bringes en strøm av fortrinnsvis vann at passere langs med membranene, motsvarende den på retenatsiden. Trykket kan være like på begge sider av membranene da osmosen driver permeatet gjennom membranene. Opplosning skjer i vesken som sirkuler på permeatsiden.

15 Forutsetningen for at osmosen skal fungere er at konsentrasjonen av aminosyrer og peptider er høyere på retenat siden av membranene. Dette oppnås gjennom at destillat fra konsentrasjonsanlegget er den veske som bringes at sirkulere på permeatsiden av membranen.

20 Dette kan i prinsippet beskrives som en omvent diafiltrering der det er på permeatsiden man bruker additivt rent vann.

Konsentrasjonen av permeatet kan gjøres med et annet membranfilter anordnet for omvent osmose (RO). Funksjonen av membranfilteret blir lik.

25 En serie av filter kan brukes for at skille ut ulike fraksjoner, med hensyn til maksimal peptidstørrelse, men ved de etterfølgende har man ingen hjelp av enzymkomplekset for at holde filtermembranene frie fra filterkake på retenatsiden. Det kan være fordelaktigt at filtrere i ett trinn før at unngå blokkering.

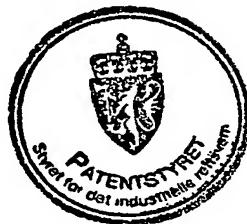
30 Verdier som er oppnådde ved laboratorieforsøk ved bruk av dialysemembran av standard slangeformet type som brukes innfor sykehusområdet av fabrikat Spectrum Laboratoris.

I forsøk ble det anvendt Spectra/Por 1 Regenerated Cellulose (RC) med Molecular Weight Cut-Off (MWCO) eller 6,000 til 8,000 dalton (6k to 8k MWCO).

35 Fluksen gjennom disse membraner ved total TS (tørrstoff) på retenatsiden på 14,7 % med temperatur 48,7 ° C og pH 7,85 var ved start 3,7 ml/cm<sup>2</sup>/h. Etter 12 timer 3,8

ml/cm<sup>2</sup>/h og etter 24 timer 3,8 ml/cm<sup>2</sup>/h. Blokkering kunde ikke registreres enda med 60 timers drifttid.

Ingen molekyler over 9000 dalton kunne identifiseres i permeatet, med peptid  
størrelsesanalyse før og etter konsentrering av de totalt 23 l væske med 36 % TS som  
5 produsertes i løpet av totalt 60 timer. Største topp på spektrogrammet lå fra 410-1350  
Dalton som uten korrigering gav 42% av spektrogrammets areal.



P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for utvinning av peptider/aminosyrer og olje/fett fra en proteinholdig

5 råvarer karakterisert ved at den innbefatter følgende trinn:

- a. å kverne råvarene;
- b. å oppvarme den kvernede råvarene til temperaturer i området fra 40 - 62°C, fortrinnsvis 45 - 58°C;
- 10 c. å eventuelt før og/eller etter oppvarmingen separere olje/fett fra råvarene for å oppnå et første oljeprodukt;
- d. å tilsette vann som holder tilnærmet eller samme temperatur som råvarene, hvor pH-verdien av vannet er justert ved tilførsel av kalsium;
- e. å hydrolysere råvarene med endogene enzymer for å fremstille et
- 15 hydrolysat;
- f. å eventuelt under hydrolyseringen tilsette en pH-regulator for å opprettholde den ønskede pH-verdi i hydrolysatet;
- g. å fjerne faste partikler og ikke hydrolyserte proteiner som kan returneres til hydrolysen fra hydrolysatet;
- 20 h. å periodisk eller kontinuerlig skille ut fett/olje, for å oppnå et andre oljeprodukt;
- i. å eventuelt behandle hydrolysatet mot mikroorganismevekst, fortrinnsvis ved UV-behandling;
- j. å utskille den molekylvektfraksjon av peptider/aminosyrer som ønskes ved
- 25 membranfiltrering, fortrinnsvis av crossflow type;
- k. å tilbakeføre de deler av hydrolysatet som ikke penetrerer membranfiltret i punkt j tilbake til hydrolysen i trinn e;
- l. å konsentrere og eventuelt tørke permeaten, for å oppnå peptider/aminosyrer;
- 30 m. å helt eller delvis tilbakeføre destillatet fra konsentrasjonen til membranfilterets permeatside.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at den

35 forgår som en lukket prosess.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at pH-regulatoren i trinn f er nitrogengass eller benmel.
- 5 4. Fremgangsmåte ifølge krav1, karakterisert ved at den videre omfatter å skille de faste partiklene fra trinn g i hydroksyapatitt, proteinrester og andre faste partikler.
- 10 5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at det andre oljeproduktet som utvindes i trinn h føres gjennom et filter, og eventuell tunge deler (f. eks. stearinsyre) fjernes for å oppnå en kaldpresset, proteinfri, steril olje.
- 15 6. Fremgangsmåte for hydrolysing av en eller flere proteinholdig råvarer og utskillelse av aminosyrer/peptider karakterisert ved at hydrolyseringen foregår ved hjelp av den eller de proteinholdige råvarenes egne endogene enzymer og at hydrolysatet føres gjennom et membran lignende filter, hvor 20 peptider/aminoxyrer følger en permeat strøm, mens de aktive enzymene kontinuerlig nedbryter eventuelle proteinrester som avleires på membranoverflaten og enzymene føres sammen med retenatet tilbake til hydrolysen.
7. 25 Fremgangsmåte for utskillelse av peptider og aminosyrer fra en hydrolyseblanding karakterisert ved at hydrolyseblandingen omfattende aktive enzymer, aminosyrer, peptider og ikke omdannede proteiner føres henover et membranfilter, hvor aminosyrer og eventuelt peptider filtreres fra og de tilstedevarende aktive enzymene sørger for å nedbryte proteiner som avleires på membranfiltret.
- 30 8. Anvendelse av en av fremgangsmåtene ifølge krav 1, 6 eller 7 for fremstilling av et farmasøytisk produkt.
- 35 9. Anvendelse av en av fremgangsmåtene ifølge krav 1, 6 eller 7 for fremstilling av et bioteknologisk produkt.

10.

Anvendelse av en av fremgangsmåtene ifølge krav 1, 6 eller 7 for fremstilling av et  
5 næringsmiddelprodukt.

11.

Anvendelse av en av fremgangsmåtene ifølge krav 1, 6 eller 7 for fremstilling av et  
førprodukt.

10

12.

Anvendelse av fremgangsmåten ifølge krav 4 for fremstilling av hydroksyapatitt.

13.

15 Aminosyrer/peptider fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 1, k a r a k -  
t e r i s e r t v e d at de ikke inneholder allergener og DNA-spor og er  
tilnærmedesvis fettfrie og har et saltinnhold på <0,5 vekt-%.

14.

20 Olje fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at den ikke inneholder allergener og DNA-spor.

15.

Hydroksyapatitt fremstilt ved fremgangsmåten ifølge krav 4, k a r a k t e r i -  
25 s e r t v e d at det ikke inneholder allergener og DNA-spor.



